



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 42 44 418 A 1**

⑤① Int. Cl.⁵:
A 61 K 7/48
A 61 K 37/02

②① Aktenzeichen: P 42 44 418.7
②② Anmeldetag: 30. 12. 92
②③ Offenlegungstag: 1. 7. 93

DE 42 44 418 A 1

③⑩ Innere Priorität: ③② ③③ ③①
30.12.91 DE 41 43 178.2

⑦① Anmelder:
Quelle, Gerhard, 6948 Wald-Michelbach, DE

⑦④ Vertreter:
Hach, H., Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 7100 Heilbronn

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤④ Peptid-Präparate und Verfahren zu deren Herstellung

⑤⑦ Die Erfindung betrifft Peptid-Präparate und Verfahren zu dessen Herstellung vorzugsweise durch partielle Hydrolyse von Bindegewebe, Kollagen, Elastin und Keratin, die Tripeptide oder Peptidsequenzen Gly-His-Lys und/oder Gly-Asp-Ser enthalten.

DE 42 44 418 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Peptid-Präparate und Verfahren zu deren Herstellung.

Bei der Suche nach wirksamen Inhaltsstoffen aus tierischen Geweben für die Anwendung in der Medizin, Biotechnologie und Kosmetik wurden in den vergangenen Jahrzehnten eine große Zahl von Substanzen und Substanzgemischen extrahiert, vollständig oder partiell charakterisiert und erfolgreich angewandt. Stellvertretend seien nur einige wenige Substanzen erwähnt, wie Epidermal Growth Factor, Kollagen Typ I und Typ III und Hyaluronsäure (British Medical Bulletin, vol. 45, no. 2, 1989, "Growth Factors", ed. M. D. Waterfield, Churchill Livingstone, Edinburgh; Collagen in Health and Disease, eds. J. B. Weiss and M. I. V. Jayson, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982; Methods in Enzymology, vol. 82, 1982, "Structural and Contractile Proteins, Part A", eds. L. W. Cunningham and D. W. Frederiksen, vol. 144, 1987, "Structural and Contractile Proteins, Part D", ed. L. W. Cunningham, Academic Press, Inc., Orlando).

Viele der bisher gefundenen Wirkstoffe sind sehr komplexe Moleküle, wie Proteine, Polypeptide oder Mucopolysaccharide, die aus kleinen Bausteinen von den Gewebezellen synthetisiert werden. Das Ziel bisheriger Bemühungen war im wesentlichen die Extraktion, mit eventuell anschließender chemisch-physikalischer Modifikation dieser komplexen Moleküle, um sie dann sinnvoll anzuwenden.

Durch enzymatischen oder chemisch-physikalischen Abbau verlieren diese Makromoleküle jedoch in der Regel ihre Wirkung oder erfahren Wirkungseinbußen oder Wirkungsverschiebungen. Wenn zum Beispiel Kollagen zu Gelatine abgebaut wird, verringert sich das für die Kosmetik wichtige Wasserbindevermögen [Parfümerie und Kosmetik 65 (7), 1984, 391 bis 401, Alexander Berg: "Einsatz von Proteinen in der Kosmetik"; RAK — Riechstoffe, Aromen, Kosmetica (7), 1977, R. Riemschneider, W. H. Chik: "Über das Wasserbindevermögen löslicher Kollagene"]. Beim weiteren Abbau von Gelatine zu Gelatinehydrolysat werden Peptide mit einem Molekulargewicht von 500 bis 30 000 Dalton freigesetzt, die im Vergleich zur Gelatine ein besseres Aufziehvermögen für Haare besitzen und daher im Bereich der Haarpflege große Bedeutung erlangt haben.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Entdeckung, daß die unter definierten Bedingungen gewonnenen Partialhydrolysate, die daraus isolierten Peptide und die Mischungen von Aminosäuren und Peptiden, deren Aminosäuresequenzen mit den Teilabschnitten der Protein-Aminosäuresequenz übereinstimmen, neue Wirkungseigenschaften besitzen, die über die Wirkung der intakten Proteine deutlich hinausgehen.

Als Beispiel wird kurz auf Kollagen Typ I hingewiesen.

Kollagene, von denen mindestens 13 unterschiedliche Typen isoliert und charakterisiert wurden, dienen vorwiegend als Strukturproteine im Bindegewebe multizellulärer Organismen. Spezifische Zellen, wie zum Beispiel Fibroblasten in der Dermis, synthetisieren die nadelförmigen Proteinmoleküle, die aus drei miteinander verdrehten, kabelähnlichen Polypeptiden zusammengesetzt sind. Bei Kollagen Typ I besitzen zwei der drei Polypeptide identische Aminosäuresequenzen und werden als α -1(I)-Polypeptide bezeichnet (Fig. 4), während das dritte Polypeptid, α -2(I), eine andere Aminosäuresequenz hat (Fig. 5). Jedes Polypeptid enthält etwa 1000 Aminosäuren. Das gesamte Protein hat eine Länge von ca. 0,3 μ m und einen Durchmesser von ca. 0,0015 μ m.

Wegen der filmbildenden Eigenschaften und des großen Wasseraufnahmevermögens wird Kollagen in bedeutenden Mengen in der Kosmetik eingesetzt. Die kosmetische Wirkung von Kollagen war bisher im wesentlichen auf diese Eigenschaften beschränkt, bedingt sowohl durch die chemische Struktur des Kollagens als auch durch die Molekülgröße, die ein Eindringen in die Haut verhindert.

Wenn dagegen ein Partialhydrolysat von Kollagen unter genau definierten Bedingungen hergestellt wird (siehe Herstellung Präparat A) oder ein Gemisch aus Aminosäuren und Peptiden zubereitet wird (Herstellung Präparat B), dessen Aminosäurezusammensetzung der Kollagen-Aminosäure-Analyse annähernd entspricht und dessen Peptide Aminosäuresequenzen haben, die mit bestimmten Kollagen-Aminosäuresequenzen exakt übereinstimmen (Fig. 4 und 5), so weisen diese Präparate neue positive Wirkungen und Eigenschaften auf.

Diese Wirkungen sind zum Teil in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die wirksamen Präparate werden darin Präparat B und GHL-Peptid (GHL = Glycyl-Histidyl-Lysin = Tripeptidfraktion A) genannt, und sie werden mit den Eigenschaften des nativen Kollagens verglichen.

DE 42 44 418 A1

Tabelle 1

Wirkungsvergleich zwischen nativem Kollagen, Präparat B und dem GHL-Peptid

Wirkung/Eigenschaften	Kollagen	Präparat B	GHL-Peptid	
Feuchtigkeitsrückhaltevermögen	++	+	—	P
Zellatmungsaktivierend (Stimulierung des Zellstoffwechsels)	—	++	—	P
Pufferkapazität	+	++	—	P
Stimulierung der Kollagensynthese bei Fibroblasten	—	++	++	P
Förderung der Wundheilung	+	+	+	P
Radikalfängerwirkung	—	++	+	P
Superoxid-Dismutase-Wirkung	—	++	++	P
Immunstimulierende Wirkung	—	+	+	P
Penetrationsvermögen (Epidermis)	—	+	+	P
Gefahr durch Kontamination mit Säugetierviren	++	—	—	N
Denaturierung bei 30–37°C	++	—	—	N
P = Positive Eigenschaft N = Negative Eigenschaft				

Diese Partialhydrolysate, isolierten Peptide und Präparate aus Aminosäuren und Peptiden sind von besonderer Bedeutung

1. für die Biotechnologie, als Zusatz für Zellkultur-Nährlösungen für serumarme oder definierte, serumfreie Zellkultur-Nährmedien (Applikationsbeispiel 1),
2. für die Medizin, als wundheilungsförderndes Mittel (Applikationsbeispiel 2), zur Immunstimulation und Wirkstoff zur Erhöhung der körpereigenen Erythropoetinbildung, und
3. für die Kosmetik, zur Pflege der Haut, als Anti-Aging-Faktor und Radikalfängerkomplex (Applikationsbeispiele 3 bis 5).

Grundsätzliche Methoden der Herstellung

1. Synthetische Herstellung

Die Komponenten der Rezeptur (Tabellen 2 bis 14: Rezepturfractionen) werden in geeigneter Weise vorgelegt und gemischt. Einzelne Komponenten der Rezeptur, wie zum Beispiel die Tripeptidfraktion A und Tripeptidfraktion B, werden nach der Partialhydrolyse (grundsätzliche Methoden der Herstellung 3 bis 5) mit Hilfe chromatographischer Methoden gereinigt, isoliert, konzentriert und anschließend dem Präparat zugegeben.

2. Halbsynthetische Herstellung

Komponenten der Rezeptur werden mit gentechnologisch gewonnenen Substanzen und/oder mit Partialhydrolysaten (siehe grundsätzliche Methoden der Herstellung 3 bis 5) gemischt.

3. Partialhydrolysat mit verdünnter Salzsäure

Tierhaut oder Tierlunge, Kollagen, Gelatine oder Elastin werden, wie in Anspruch 2 beschrieben, hydrolysiert, anschließend filtriert, neutralisiert und mit Hilfe zum Beispiel der Umkehrosmose entsalzt. Gegebenenfalls erfolgt eine Behandlung mit 1N-NaOH, eine Stunde bei Zimmertemperatur, mit anschließender Neutralisation und erneuter Entsalzung.

4. Enzymatisches Partialhydrolysat mit Kollagenase aus Clostridium histolyticum

Dieses Enzym spaltet die sich wiederholende Gly-X-Y-Gly-X-Y-Gly-X-Y-Gly-Aminosäuresequenz des Kollagens zwischen dem Y und Glycin (X, Y stehen für unterschiedliche Aminosäuren in der Kollagen-Aminosäuresequenz). Tierhaut oder Tierlunge bzw. Kollagen Typ I wird in Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, in Anwesenheit von CaCl₂ 90 Minuten bei 37°C mit Kollagenase behandelt und die Lösung anschließend 24 Stunden bei +4°C dialysiert, konserviert und sterilfiltriert.

5. Partialhydrolysat von Hautkeratin mit Pepsin

Tierepidermis wird im Citrat-HCl-Puffer, pH 1,5, 24 Stunden bei Zimmertemperatur mit Pepsin behandelt (Verhältnis Pepsin zu Substrat 1 : 10), dialysiert, 24 Stunden bei pH 10,5 bei Zimmertemperatur gelagert, 1 Stunde mit 1N-NaOH bei Zimmertemperatur behandelt, neutralisiert, entsalzt und sterilfiltriert.

DE 42 44 418 A1

6. Gentechnisch gewonnene Proteinsequenzen

Geeignete Mikroorganismen werden nach bekannten Techniken so behandelt, daß sie veränderte Kollagen-, Elastin- und Hautkeratinmoleküle synthetisieren, die eine größere Anzahl wirksamer Peptidsequenzen enthalten. Diese veränderten Proteine erhöhen die Ausbeute bei der Gewinnung wirksamer Peptidsequenzen durch partielle Hydrolyse.

7. Natürliches Präparat

Das natürliche Präparat entspricht den Beschreibungen gemäß Anspruch 2 und den grundsätzlichen Methoden der Herstellung 3 bis 5.

Tabelle 2

Beispiele 1 bis 6 (jeweils g/L Präparat)

Aminosäuren	Bereich	CAS-1	CAS-2	CAS-3	CAS-4	CAS-5	CAS-6
20 L-Alanin	0—80	4,1	5,1	7,0	9,0	20,0	—
L-Arginin HCl	0—80	4,2	5,2	7,5	10,0	—	—
L-Asparaginsäure	0—5	2,8	3,5	4,0	5,0	—	—
L-Cystein	0	—	—	—	—	—	—
L-Glutaminsäure	0—8	4,7	5,9	6,0	8,0	—	—
25 Glycin	0—100	10,6	13,2	65,0	35,0	50,0	80,0
L-Histidin HCl	0—2	0,8	1,0	—	1,0	—	—
L-Hydroxyprolin	0—55	6,2	6,2	6,0	15,0	—	—
L-Isoleucin	0—12	0,7	0,9	2,0	3,0	—	—
L-Leucin	0—12	1,5	1,9	2,0	2,0	—	—
30 L-Lysin HCl	0—24	2,2	2,8	4,0	8,0	—	—
L-Methionin	0—4	0,3	0,4	—	1,0	—	—
L-Phenylalanin	0—10	0,9	1,1	1,0	2,0	—	—
L-Prolin	0—70	6,6	8,2	—	15,0	60,0	—
L-Serin	0—12	1,4	1,8	3,0	6,0	10,0	—
35 L-Threonin	0—10	1,0	1,2	1,0	3,0	—	—
L-Tryptophan	0	—	—	—	—	—	—
LTyrosin	0—3	0,2	1,0	1,0	1,0	—	—
L-Valin	0—20	1,2	—	2,0	4,0	—	—

Die in den Tabellen 2 bis 5 genannten Aminosäuren stehen vorwiegend für Aminosäuren pflanzlichen Ursprungs.

Tabelle 3

Beispiele 7 bis 12 (jeweils g/L Präparat)

Aminosäuren	Bereich	EAS-1	EAS-2	EAS-3	EAS-4	EAS-5	EAS-6
50 L-Alanin	0—100	2,5	10,55	20,0	25,0	50,0	50,0
L-Arginin HCl	0—50	0,2	0,65	1,5	8,0	—	—
L-Asparaginsäure	0—5	0,15	0,5	1,0	5,0	—	—
L-Cystein	0—0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—
55 L-Glutaminsäure	0—10	0,3	1,2	3,0	5,0	—	—
Glycin	0—100	4,0	12,75	25,0	40,0	40,0	—
L-Histidin HCl	0—1	0,02	0,06	0,1	0,15	—	—
L-Hydroxyprolin	0—10	0,2	0,75	5,0	10,0	—	—
L-Isoleucin	0—15	0,6	1,85	3,0	5,0	—	—
60 L-Leucin	0—12	2,0	4,3	5,0	5,0	—	—
L-Lysin HCl	0—30	0,1	0,25	2,0	3,0	—	—
L-Methionin	0	—	—	—	—	—	—
L-Phenylalanin	0—10	1,0	2,95	3,0	3,0	—	—
L-Prolin	0—40	2,0	5,8	8,0	20,0	20,0	40,0
65 L-Serin	0—20	0,2	0,45	1,0	2,0	—	—
L-Tryptophan	—	—	—	—	—	—	—
LTyrosin	0—3	0,2	0,65	1,0	1,5	—	—
L-Valin	0—20	3,0	8,25	10,0	12,0	—	—

DE 42 44 418 A1

Tabelle 4

Beispiele 13 bis 18 (jeweils g/L Präparat)

Aminosäuren	Bereich	KAS-1	KAS-2	KAS-3	KAS-4	KAS-5	KAS-6	5
L-Alanin	0–20	0,2	2,2	7,0	10,0	10,0	—	
L-Arginin HCl	0–20	0,2	2,15	6,5	8,0	15,0	—	
L-Asparaginsäure	0–5	0,4	3,85	4,0	4,0	—	—	10
L-Cystein	0–0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	
L-Glutaminsäure	0–8	0,6	6,25	6,0	6,0	—	—	
Glycin	0–100	1,0	10,0	30,0	35,0	—	80,0	
L-Histidin HCl	0–1	0,1	1,0	1,0	1,0	—	—	
L-Hydroxyprolin	—	—	—	—	—	—	—	15
L-Isoleucin	0–10	0,2	1,85	5,5	6,0	—	—	
L-Leucin	0–12	0,4	3,35	6,0	8,0	—	—	
L-Lysin HCl	0–25	0,25	2,3	12,0	15,0	20,0	—	
L-Methionin	0–4	0,1	0,5	1,5	2,0	—	—	20
L-Phenylalanin	0–8	0,2	1,5	4,0	2,0	—	—	
L-Prolin	0–22	0,25	2,2	8,0	10,0	—	—	
L-Serin	0–15	0,7	6,7	10,0	12,0	15,0	—	
L-Threonin	0–10	0,2	1,85	5,0	6,0	10,0	10,0	
L-Tryptophan	0–0,5	0,05	0,2	0,2	0,2	—	—	25
L-Tyrosin	0–3	0,2	1,5	1,5	1,5	—	—	
L-Valin	0–15	0,2	1,8	3,0	4,0	—	—	

Tabelle 5

Beispiele 19 bis 24 (jeweils g/L Präparat)

Aminosäuren	Bereich	BAS-1	BAS-2	BAS-3	BAS-4	BAS-5	BAS-6	30
L-Alanin	0–50	4,1	5,3	7,0	11,0	20,0	—	35
L-Arginin HCl	0–50	4,2	5,2	7,0	10,0	20,0	—	
L-Asparaginsäure	0–5	0,3	3,5	4,0	4,0	—	—	
L-Cystein	0–0,1	0,01	0,01	0,01	0,01	—	—	
L-Glutaminsäure	0–6	4,7	5,0	5,0	5,0	—	—	40
Glycin	0–80	10,6	13,5	20,0	25,0	40,0	20,0	
L-Histidin HCl	0–1	0,8	1,0	1,0	1,0	—	—	
L-Hydroxyprolin	0–50	6,2	6,2	10,0	12,0	10,0	—	
L-Isoleucin	0–9	0,7	0,9	2,0	3,0	—	—	45
L-Leucin	0–10	1,5	2,0	3,0	4,0	—	—	
L-Lysin HCl	0–25	2,2	2,8	5,0	10,0	20,0	—	
L-Methionin	0–4	0,3	0,4	0,6	0,0	—	—	
L-Phenylalanin	0–10	0,9	1,2	1,5	2,0	—	—	
L-Prolin	0–70	6,6	8,3	12,0	16,0	30,0	60,0	50
L-Serin	0–12	1,4	1,8	3,0	5,0	—	—	
L-Threonin	0–10	1,0	1,2	2,0	3,0	10,0	10,0	
L-Tryptophan	0–0,1	0,001	0,001	0,001	0,01	—	—	
L-Tyrosin	0–2	0,2	0,2	0,3	0,4	—	—	
L-Valin	0–15	1,2	1,7	—	—	—	—	55

DE 42 44 418 A1

Tabelle 6

Beispiele 25 bis 30 (jeweils mg/L Präparat)

5	Peptide	Bereich	CP-1	CP-2	CP-3	CP-4	CP-5	CP-6
	X-Y-Ala-Ala-X-Y	0,2–20	1	3	5	20	—	—
	X-Y-Ala-Gly-X-Y	0,2–30	2	12	20	—	—	—
10	X-Y-Ala-Pro-X-Y	—	—	—	—	—	—	—
	X-Y-Arg-Gly-X-Y	0,2–30	0,25	1	2	—	—	—
	X-Y-Gly-Ala-X-Y	0,2–20	4	7	10	—	—	—
	X-Y-Gly-Glu-X-Y	0,2–25	2	4	10	—	—	—
	X-Y-Gly-Gly-X-Y	1,0–200	75	25	30	200	—	200
15	X-Y-Gly-Ser-X-Y	1,0–40	1	2	5	—	—	—
	X-Y-Gly-Leu-X-Y	1,0–100	5	10	20	50	—	50
	X-Y-Gly-Pro-X-Y	0,2–20	1	2	5	—	—	—
	X-Y-Gly-Thr-X-Y	0,2–20	1	2	5	—	—	—
	X-Y-Gly-Val-X-Y	0,5–40	2	5	5	—	—	—
20	X-Y-Pro-Gly-X-Y	0,5–30	1,5	3	3	—	—	—
	X-Y-Pro-Leu-X-Y	0,2–20	1	2	5	—	—	—
	X-Y-Val-Gly-X-Y	—	—	—	—	—	—	—
	X-Y-Val-Pro-X-Y	—	—	—	—	—	—	—
	X-Y-Gly-Gly-Gly-X-Y	5,0–100	10	15	20	50	—	—
25	X-Y-Gly-Ala-Ala-X-Y	0,1–20	0,2	1	2	—	—	—
	X-Y-Gly-Asp-Ser-X-Y	0,01–400	—	—	2	—	—	—
	X-Y-Gly-His-Lys-X-Y	0,001–360	—	2	5	100	2	360
	X-Y-Gly-Pro-Ala-X-Y	0,1–50	0,2	1	2	—	—	—
	X-Y-Gly-Ser-Ala-X-Y	0,1–50	0,3	1	2	—	—	—
30	X-Y-Gly-Gly-Ala-X-Y	0,1–50	—	1	2	—	—	—
	X-Y-Ala-Ala-Gly-X-Y	0,1–50	—	—	—	—	—	—
	Tripeptidfraktion	—	2	—	—	—	—	—

35 Die Buchstaben X, Y stehen für Aminosäuren beliebiger Art und Menge von jeweils 0 bis maximal 50.
Die Peptide in den Tabellen 6 bis 8 können als natürliche isolierte Peptide oder/und als synthetisch hergestellte Peptide eingesetzt werden.

40

45

50

55

60

65

DE 42 44 418 A1

Tabelle 7

Beispiele 31 bis 36 (jeweils mg/L Präparat)

Peptide	Bereich	BP-1	BP-2	BP-3	BP-4	BP-5	BP-6	5
X-Y-Ala-Ala-X-Y	0,1–20	1	3	3	10	—	—	
X-Y-Ala-Gly-X-Y	0,1–30	2	12	20	—	—	—	
X-Y-Ala-Pro-X-Y	0,1–20	—	0,1	—	—	—	—	10
X-Y-Arg-Gly-X-Y	0,1–30	0,25	1	2	—	—	—	
X-Y-Gly-Ala-X-Y	0,1–20	4	7	10	—	—	—	
X-Y-Gly-Glu-X-Y	0,1–25	2	4	10	—	—	—	
X-Y-Gly-Gly-X-Y	1,0–200	75	26	30	100	—	200	
X-Y-Gly-Ser-X-Y	1,0–50	1	2	5	—	—	—	15
X-Y-Gly-Leu-X-Y	1,0–100	5	10	20	75	—	75	
X-Y-Gly-Pro-X-Y	0,1–20	1	2	5	—	—	—	
X-Y-Gly-Thr-X-Y	0,1–20	1	2	5	—	—	—	
X-Y-Gly-Val-X-Y	0,2–50	2	5	5	—	—	—	
X-Y-Pro-Gly-X-Y	0,2–30	1,5	3	3	—	—	—	20
X-Y-Pro-Leu-X-Y	0,1–20	1	2	5	—	—	—	
X-Y-Val-Gly-X-Y	0,1–2	—	0,2	—	—	—	—	
X-Y-Val-Pro-X-Y	0,1–2	—	0,3	—	—	—	—	
X-Y-Gly-Gly-Gly-X-Y	2,0–100	10	15	20	50	—	—	
X-Y-Gly-Ala-Ala-X-Y	0,1–20	0,2	1	2	—	—	—	25
X-Y-Gly-Asp-Ser-X-Y	0,01–400	—	—	2	—	—	—	
X-Y-Gly-His-Lys-X-Y	0,001–360	—	2	5	100	2	360	
X-Y-Gly-Pro-Ala-X-Y	0,1–50	0,2	1	2	—	—	—	
X-Y-Gly-Ser-Ala-X-Y	0,1–50	0,3	1	2	—	—	—	
X-Y-Gly-Gly-Ala-X-Y	0,1–50	—	1	2	—	—	—	30
X-Y-Ala-Ala-Gly-X-Y	0,1–50	—	1	2	—	—	—	
Tripeptidfraktion	—	—	2	—	—	—	—	
Hautpartialhydrolysat	1,0–500	—	500	—	—	—	—	

Tabelle 8

Beispiele 37 bis 42 (jeweils mg/L Präparat)

Peptide	Bereich	EP-1	EP-2	EP-3	EP-4	EP-5	EP-6	40
X-Y-Ala-Pro-X-Y	1–40	3	10	15	40	—	—	
X-Y-Gly-Gly-X-Y	10–300	5	40	200	200	200	400	
X-Y-Gly-Val-X-Y	5–340	4	25	25	—	25	—	45
X-Y-Val-Gly-X-Y	2–20	2	10	10	—	10	—	
X-Y-Val-Pro-X-Y	1–30	3	3	3	—	—	—	

Tabelle 9

Beispiele 43 bis 48 (jeweils mg/L Präparat)

Spurenelemente	Bereich	CTS-1	CTS-2	CTS-3	CTS-4	CTS-5	CTS-6	55
Eisen-(II)-lactat	0,1–50 mg	—	—	—	—	—	—	
Magnesiumsulfat	1,0–2000 mg	—	50,0	1600	1600	1600	1600	
Natriummolybdat	0,1–1 mg	—	0,5	0,8	0,8	0,8	1,0	60
Mangansulfat	1,0–10 mg	—	0,5	0,8	0,8	0,8	1,0	
Zinksulfat	0,1–10 mg	—	—	—	—	—	—	
Cobaltsulfat	0,01–0,5 mg	—	0,05	0,08	0,08	0,08	0,1	

DE 42 44 418 A1

Tabelle 10

Beispiele 49 bis 54 (jeweils mg/L Präparat)

Spurenelemente	Bereich	BTS-1	BTS-2	BTS-3	BTS-4	BTS-5	BTS-6
Eisen-(II)-lactat	0,1 – 50 mg	10,0	20,0	50,0	20,0	20,0	20,0
Magnesiumsulfat	1,0 – 2000 mg	50,0	50,0	2000	2000	2000	2000
Natriummolybdat	0,1 – 1 mg	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mangansulfat	1,0 – 10 mg	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Zinksulfat	0,1 – 10 mg	0,2	0,2	—	1,0	1,0	1,0
Cobaltsulfat	0,02 – 0,5 mg	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabelle 11

Beispiele 55 bis 60 (jeweils g/L Präparat)

Antioxidantien, Radikalfänger und Hilfsstoffe	Bereich	CAH-1	CAH-2	CAH-3	CAH-4	CAH-5	CAH-5
Natriumascorbat	0,5 – 30 g	1,0	1,0	0,8	—	—	—
Mannit	10,0 – 30 g	20,0	20,0	15,0	—	—	—
Sorbit	10,0 – 500 g	—	—	15,0	100,0	50,0	—
Glycerin	10,0 – 900 g	50,0	50,0	80,0	100,0	100,0	900,0
Natriumlactatlösung	10,0 – 500 g	20,0	20,0	15,0	—	—	—
Citronensäure	1,0 – 100 g	—	20,0	15,0	1,0	1,0	—
Ethanol	1,0 – 300 g	—	16,0	12,0	—	—	—
Panthenol	10,0 – 500 g	—	—	105,0	110,0	200,0	—
Sojapeptide	0,1 – 300 g	1,0	1,0	1,5	1,4	1,4	1,4
Hydroxybenzoesäure- methylester-Natriumsalz	1,0 – 2 g	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Phenonip	2,0 – 4 g	2,0	—	2,0	2,0	2,0	2,0

Tabelle 12

Beispiele 61 bis 66 (jeweils g/L Präparat)

Antioxidantien, Radikalfänger und Hilfsstoffe	Bereich	BAH-1	BAH-2	BAH-3	BAH-4	BAH-5	BAH-5
Natriumascorbat	0,5 – 30 g	1,0	3,0	—	2,0	—	—
Mannit	10,0 – 30 g	20,0	25,0	—	—	—	—
Sorbit	10,0 – 500 g	10,0	100,0	50,0	50,0	50,0	—
Glycerin	10,0 – 900 g	50,0	50,0	50,0	50,0	100,0	200,0
Natriumlactatlösung	10,0 – 500 g	15,0	20,0	20,0	20,0	20,0	—
Citronensäure	1,0 – 100 g	10,0	10,0	10,0	2,0	2,0	2,0
Ethanol	1,0 – 300 g	12,0	10,0	10,0	—	—	—
Panthenol	10,0 – 500 g	—	100,0	200,0	300,0	200,0	500,0
Sojapeptide	0,1 – 50 g	1,0	1,0	1,5	1,4	1,4	1,4
Hydroxybenzoesäure- methylester-Natriumsalz	1,0 – 2 g	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Phenonip	2,0 – 4 g	—	—	2,0	2,0	2,0	2,0

DE 42 44 418 A1

Tabelle 13

Beispiele 66 bis 72 (jeweils g/L Präparat)

Weitere Inhaltsstoffe	Bereich	CMS-1	CMS-2	CMS-3	CMS-4	CMS-5	CMS-6	5
Saccharide:								
Glucose	1,0–200 g	—	20,0	15,0	50,0	100,0	150,0	
Galaktose	1,0–30 g	5,0	—	—	20,0	—	—	10
Mannose	—	—	—	—	—	—	—	

Tabelle 14

Beispiele 73 bis 78 (jeweils µg, mg oder g/L Präparat)

Weitere Inhaltsstoffe	Bereich	BMS-1	BMS-2	BMS-3	BMS-4	BMS-5	BMS-6	15
Saccharide:								
Glucose	1,0–200 g	5,0	50,0	—	100,0	50,0	—	
Galaktose	0,5–50 g	0,5	2,0	—	10,0	—	20,0	
Mannose	0,5–50 g	0,5	2,0	20,0	20,0	—	—	20
Nukleotide/Nukleoside:								
Adenin	5,0–50 mg	15,0	—	30,0	25,0	20,0	—	25
Adenosin	5,0–40 mg	18,0	20,0	30,0	—	20,0	40,0	
Cytidin	5,0–30 mg	20,0	—	25,0	30,0	25,0	—	
Cytosin	5,0–30 mg	20,0	—	25,0	—	25,0	—	30
Guanin	3,0–25 mg	15,0	—	25,0	20,0	—	—	
Guanosin	3,0–25 mg	18,0	—	25,0	—	25,0	—	
Thymin	5,0–50 mg	20,0	—	40,0	40,0	35,0	50,0	
Thymidin	5,0–50 mg	20,0	—	50,0	—	30,0	—	
Inosin	10,0–100 mg	50,0	100,0	60,0	70,0	50,0	100,0	35
Proteine/Mucopolysaccharide:								
Hyaluronsäure	1,0–50 g	—	1,0	3,0	—	—	—	
Chondroitinsulfat	1,0–50 g	—	1,0	10,0	10,0	5,0	—	
Laminin	1,0–50 µg	—	1,0	3,0	3,0	3,0	5,0	
Entactin	1,0–50 µg	—	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	40
Fibrillin	1,0–50 µg	—	1,0	1,0	1,0	5,0	5,0	
Vitronectin	1,0–50 µg	—	1,0	10,0	10,0	20,0	25,0	
Fibronectin	1,0–100 µg	—	1,0	100,0	100,0	300,0	300,0	
Nidogen	1,0–50 µg	—	1,0	2,0	2,0	5,0	5,0	
Tanescin	1,0–50 µg	—	1,0	2,0	2,0	3,0	3,0	45
Filagrin	1,0–50 µg	—	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	

Herstellung von Präparat A

1 kg denaturiertes Kollagen (Gelatine) wird in 9 kg 1n-HCl-Lösung suspendiert und angelöst. Die Lösung wird in einem dicht verschlossenen Gefäß unter Rühren schnell auf 100°C erwärmt, die Temperatur 3 Stunden konstant gehalten, anschließend schnell wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 6n-NaOH-Lösung neutralisiert. Das Präparat wird mit Hilfe der Gelchromatographie bzw. anderer geeigneter Methoden entsalzt und/oder mit dest. Wasser auf ein Volumen von 20 l aufgefüllt, mit 0,2% Konservierungsmittel (zum Beispiel Phenonip oder Hydroxybenzoesäureester) konserviert und sterilfiltriert. Fig. 1 gibt eine Übersicht über die Aminosäuren und Peptide im Präparat A. Fig. 1 ist das Ergebnis einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie. Als Vergleich dient Fig. 2 mit einem Standard-Aminosäurengemisch, das unter den gleichen Bedingungen chromatographisch getrennt wurde. Fig. 1A dagegen zeigt die Aminosäuren und Peptide nach unzureichender partieller Hydrolyse.

Die biologische Wirksamkeit des Präparates A wurde durch Bestimmung der Stoffwechselaktivierung an Rattenleber-Mitochondrien geprüft. Das Präparat A verursachte eine 60%ige Stoffwechselsteigerung im Vergleich zur Kontrolle.

Zur Stabilisierung der Peptide enthielt das Präparat A die Rezepturfraction CAH-1 (Tabelle 11, Beispiel 55).

Herstellung von Präparat B

Das Präparat B enthält die Rezepturfractionen CAS-1, CTS-2, CAH-2, CMS-2 und CP-1.

0,6 kg destilliertes Wasser vorlegen und die leichtlöslichen Aminosäuren zuerst lösen. Die schwerlöslichen Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin, Phenylalanin, Tyrosin, Valin) werden in 2n-NaOH-Lösung vorgelöst. Nach Zugabe von Citronensäure wird der pH-Wert der Lösung mit 10n-NaOH im Bereich von 5 bis 9 gehalten und wird nach vollständigem Lösen der Citronensäure auf 6,5 eingestellt. Danach erfolgt Zugabe von Mannit, Glucose, Ascorbat, Natriumlactat, Ethanol, Glycerin, Sojapeptiden, Dipeptiden, Tripeptiden, Tripeptidfraktion, Spurenelementen und Hydroxybenzoesäuremethylester-Natriumsalz. Der pH-Wert wird mit 6n-HCl auf 6,5 eingestellt. Der Ansatz wird mit dest. Wasser auf 1 l Gesamtansatzmenge aufgefüllt und unter sterilen Bedingungen sterilfiltriert.

Isolierung der Tripeptidfraktion A und der Tripeptidfraktion B

Das oben beschriebene Präparat A wird vorzugsweise mit hochauflösender Säulenchromatographie, zum Beispiel mit Kieselgel 60 als Sorptionsmittel und mit Elutionslösungen, vorzugsweise Butanol/Essigsäure/Wasser 4 : 1 : 1, und Propanol/Ammoniak (25%) 7 : 3, in mindestens zwei Elutionsstufen aufgetrennt, um ein Tripeptid zu isolieren, das sich wie folgt analytisch charakterisieren läßt:

Nach saurer Hydrolyse, 24 Stunden in 6n-HCl bei 105°C, werden drei Aminosäuren freigesetzt, die nach eindimensionaler Dünnschichtchromatographie folgende hRf-Werte haben: hRf-Werte 34, 42, 11 für die Aminosäuren 1 bis 3 im Fließmittel 96% Ethanol/34% Ammoniak im Verhältnis 7 : 3 und die hRf-Werte 32, 20 und 2 für die Aminosäuren 1 bis 3 im Fließmittel 1-Propanol/Wasser im Verhältnis 7 : 3. Nach der Sequenzanalyse entspricht die Numerierung der Aminosäuren 1 bis 3 ihren Positionen im Tripeptid, beginnend mit der aminoterminalen Aminosäure. Damit ist die Tripeptidfraktion A als das Tripeptid Gly-His-Lys identifiziert.

Die entsprechenden Schritte werden eingehalten, um die Peptidfraktion B mit dem Tripeptid Gly-Asp-Ser zu identifizieren. Anstelle der isolierten Tripeptide können auch die entsprechenden, nach gängigen Verfahren synthetisierten und gereinigten Tripeptide verwendet werden.

Herstellung von Peptid-Spurenelement-Komplexen

Ein weiterer Verfahrensschritt bei der Herstellung der Peptidfraktion besteht in der Komplexierung entweder des isolierten oder des synthetisierten Tripeptids mit Kupfer; 0,01 mol/L Tripeptid mit 0,01 mol/L Kupfer(II)-acetat-Monohydrat gemischt und mit 0,1n-NaOH-Lösung neutralisiert. Die Tripeptidfraktion wird in kleinen Portionen kühl gelagert.

Wirkungsnachweise für das Präparat A, Präparat B und die Tripeptide

Die biologische Wirksamkeit des Tripeptids wurde u. a. an menschlichen Hautfibroblasten im Zellkulturversuch bestimmt (Fig. 3). Nach Zugabe von 10–8 bis 10–11 mol/l Tripeptid zum Zellkultur-Nährmedium wurde die Kollagenproduktion der menschlichen Hautfibroblasten um 50 bis 250% im Vergleich zur Kontrolle gesteigert.

Das Präparat B zeigte in einer anderen biochemischen Untersuchung eine Stoffwechselsteigerung bei Leber-Mitochondrien um 80% im Vergleich zur Kontrolle.

Ein leicht variiertes Präparat B, das die Rezepturfractionen CAS-3, CP-5, CTS-3, CAH-3 und CMS-2 enthält, verursacht eine Stoffwechselsteigerung von 80% bei Leber-Mitochondrien und besitzt außerdem die Fähigkeit, Hydroxylradikale bis zu 40% zu inaktivieren (Fig. 6).

In diesem spezifischen quantitativen Radikalfängertest werden durch Einwirkung des Enzyms Xanthinoxidase auf das Substrat Xanthin in einer Kettenreaktion hochreaktive Hydroxylradikale freigesetzt. Die viskose Hyaluronsäure in der wäßrigen Untersuchungslösung wird durch die Hydroxylradikale innerhalb von 40 Minuten zersetzt, meßbar durch den schnellen, starken Viskositätsabfall. Der gemessene Wert der Viskositätsabnahme hängt ab von der Gesamtmenge der Hydroxylradikale und der Quantität und Qualität eventuell anwesender Hydroxyl-Radikalfänger, die den Viskositätsabfall deutlich hemmen.

Herstellung von Präparat C

Das Präparat C enthält die Rezepturfractionen AS-1, BP-2, BAH-1, BMS-1 und BTS-1.

0,6 kg destilliertes Wasser werden vorgelegt und die leichtlöslichen Aminosäuren eingerührt. Die schwerlöslichen Aminosäuren werden in 2n-NaOH vorgelöst. Guanin wird in 3n-HCl unter Erwärmen auf ca. 60°C gelöst. Die vorgelösten Aminosäuren werden in den Ansatz eingerührt. Nach Zugabe von Citronensäure wird der pH-Wert der Lösung mit 10n-NaOH reguliert, so daß der pH-Wert von 5 nicht unterschritten und 9 nicht überschritten wird. Nach vollständigem Lösen der Citronensäure wird die Guanin-HCl-Lösung eingerührt und der pH-Wert auf 6,5 eingestellt. Danach erfolgt Zugabe von Mannit, Sorbit, Natriumlactatlösung, Glycerin, Ethanol, Natriumascorbat, Sacchariden, Peptiden, Nukleotiden, Tripeptidfraktion, Hautpartialhydrolysat (bezogen auf das Trockengewicht), Spurenelementen und Hydroxybenzoesäuremethylester-Natriumsalz. Der pH-Wert wird mit 6n-HCl auf 6,5 eingestellt, der Ansatz mit dest. Wasser auf 1 l Gesamtvolumen aufgefüllt und unter sterilen Bedingungen sterilfiltriert.

Die Tripeptidfraktion entspricht der obigen Beschreibung (siehe Herstellung der Tripeptidfraktionen A und B).

DE 42 44 418 A1

Herstellung des Hautpartialhydrolysats

Gewaschene und von Unterhautfettgewebe befreite Kalbshaut wird zerkleinert. 3 kg zerkleinertes Gewebe (Feuchtgewicht) wird in 7 kg 1,5n-HCl suspendiert, angelöst und in einem dicht verschlossenen Gefäß unter Rühren schnell auf 100°C erwärmt. Nach 3 Stunden bei 100°C wird schnell wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 10n-NaOH-Lösung neutralisiert. Nach mehrstufiger Filtration über Tiefenschichtenfilter wird der geklärte Extrakt mit 0,2% Hydroxybenzoesäuremethylester-Natriumsalz konserviert, der pH-Wert der Lösung auf 6,5 eingestellt und die Lösung unter sterilen Bedingungen sterilfiltriert. Nach Bestimmung des Trockengewichtes wird ein entsprechendes Volumen des Hautpartialhydrolysats — bezogen auf das Trockengewicht — in das Präparat eingebracht.

Die biologische Wirksamkeit des halbsynthetischen Bindegewebsextraktes wurde an Rattenleber-Mitochondrien geprüft. Es wurde eine Steigerung der Stoffwechselaktivität um 80% gemessen.

Applikationsbeispiele 1 und 2

Biotechnologie und Medizin

Applikationsbeispiel 1

Biotechnologie

Zur Stimulierung des Zellwachstums oder der Synthese von Stoffwechselprodukten wird serumarmen oder -freien Zellkulturmedien ca. 1 bis 5% der in dieser Erfindung beschriebenen Präparate zugesetzt. Die Zellkulturnährlösung für Hautfibroblasten hat folgende Zusammensetzung:

94% Dulbecco's Minimal Essential Medium, incl. 2 mmol/l Glutamin,
5% fötales Kälberserum.

Applikationsbeispiel 2

Medizin

Zur Förderung der Wundheilung werden ca. 2 bis 5% der beschriebenen Präparate oder mindestens 50 bis 200 mg Gly-His-Lys/kg in medizinische Salben, Crèmes, Lotionen, Tinkturen, Wundheilungssprays eingearbeitet oder Wundabdeckungen damit imprägniert.

Applikationsbeispiele 3 bis 5

Kosmetik

Mindestens drei Wirkeigenschaften der in dieser Erfindung beschriebenen Präparate weisen auf eine erfolgreiche Anwendung bei der Pflege der Haut: Die Steigerung der Stoffwechselaktivität, die Radikalfängerwirkung und die Stimulierung der Kollagensynthese von Fibroblasten.

Die kosmetischen Präparate zur Pflege der Haut: Feuchtigkeits- und Tagescremes für trockene Haut, Nachtcremes, Sonnenschutzpräparate, After-Sun-Lotionen, Anti-Falten-Cremes, Hautschutzcremes und After-Shave-Lotionen sollten eine Mindestkonzentration von 2 bis 5% der in dieser Erfindung beschriebenen Präparate enthalten.

DE 42 44 418 A1

Applikationsbeispiel 3

Feuchtigkeitscreme

5	A. Paraffin flüssig	1,5%
	Lanette 0	3,0%
	Isopropylmyristat	4,0%
	Abil AV 200	1,0%
10	Arlacel 165	6,5%
	Emulgator G-1790	3,8%
	Propyl-4-hydroxybenzoat	0,05%
	Oxyhex 2004	0,02%
	B. Allantoin	0,3%
15	Karion F flüssig	6,0%
	Methyl-4-hydroxybenzoat	0,2%
	Wasser dem.	65,43%
	C. Kollagen	5,0%
20	Präparat B	3,0%
	D. Parfumöl	0,3%

Herstellung

Phase A bei 80°C schmelzen und Phase B auf 80°C erwärmen. B unter Rühren A zusetzen. Bei 30°C die Phasen C und D einrühren.

Applikationsbeispiel 4

Tagescreme für trockene Haut

30	A. Tegomuls 90 S	6,25%
	Sonnenblumenöl	5,0%
	Erdnußöl	5,0%
	Weizenkeimöl	5,0%
35	Sheabutter	5,0%
	Phenonip	0,3%
	B. Wasser, dem.	66,85%
	D-Panthenol 50%ig	1,0%
40	Aloe vera	2,0%
	Phenonip	0,3%
	C. Präparat C	3,0%
	D. Parfumöl	0,3%

Herstellung

Phase A bei 75°C schmelzen und Phase B auf 75°C erwärmen. B in A einrühren. C bei 45°C und D bei 35°C einrühren.

DE 42 44 418 A1

Applikationsbeispiel 5

Sonnenschutzcreme

A. Arlacel 481	8,0%	5
Cremophor WO 7	2,0%	
Elfacos ST 9	2,0%	
Iso-Adipat	12,0%	
Permulin 3220	2,0%	10
Vaseline weiß	5,0%	
Magnesiumstearat	0,5%	
Aluminiumstearat	0,5%	
Isopropylmyristat	10,0%	
Uvinult 150	3,0%	15
B. 1,2-Propylenglykol	5,0%	
Magnesiumsulfat-7-Hydrat	0,7%	
Phenonip	0,25%	
Wasser	45,75%	20
C. Präparat B	3,0%	
D. Parfümöl	0,3%	

Herstellung

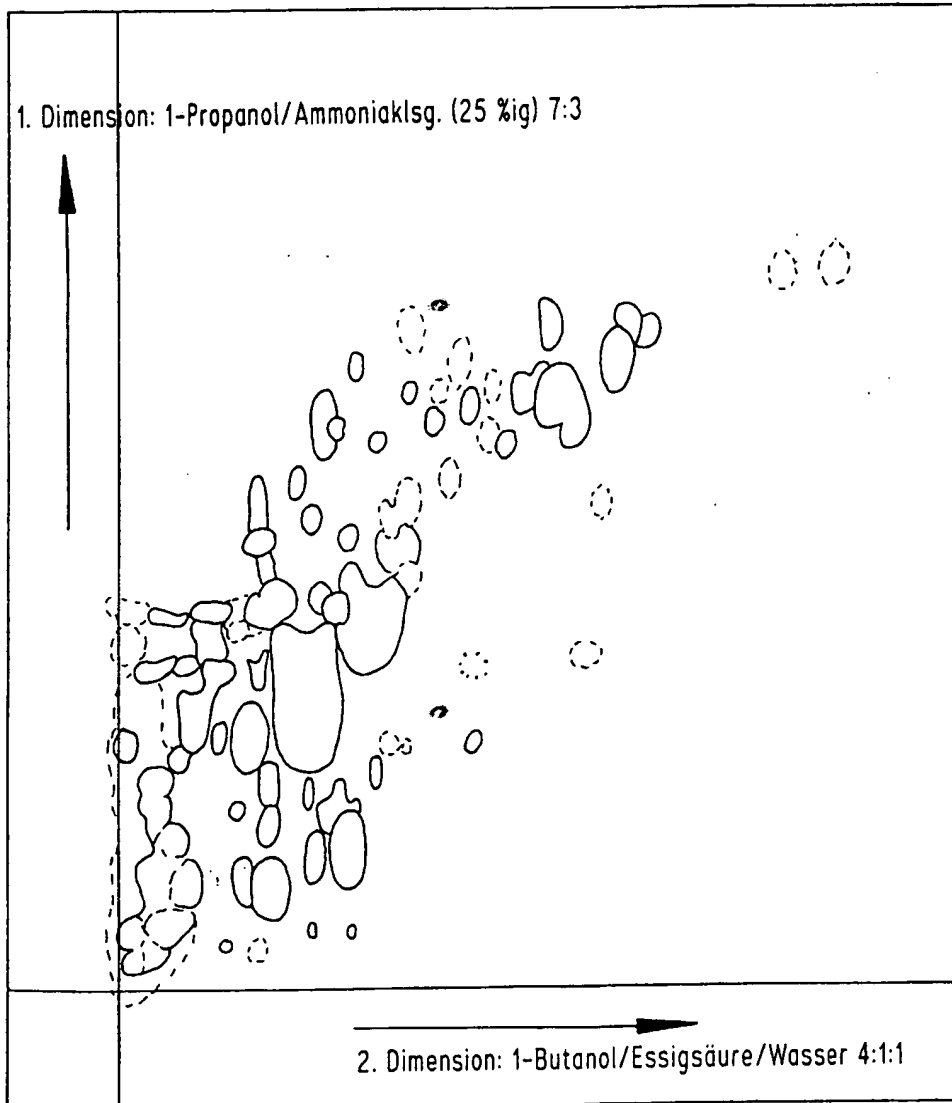
Phase A und Phase B getrennt auf 75°C erwärmen und B in Phase A langsam einrühren, homogenisieren und kaltrühren. C bei 45°C und D bei 35°C einrühren. 25

Patentansprüche

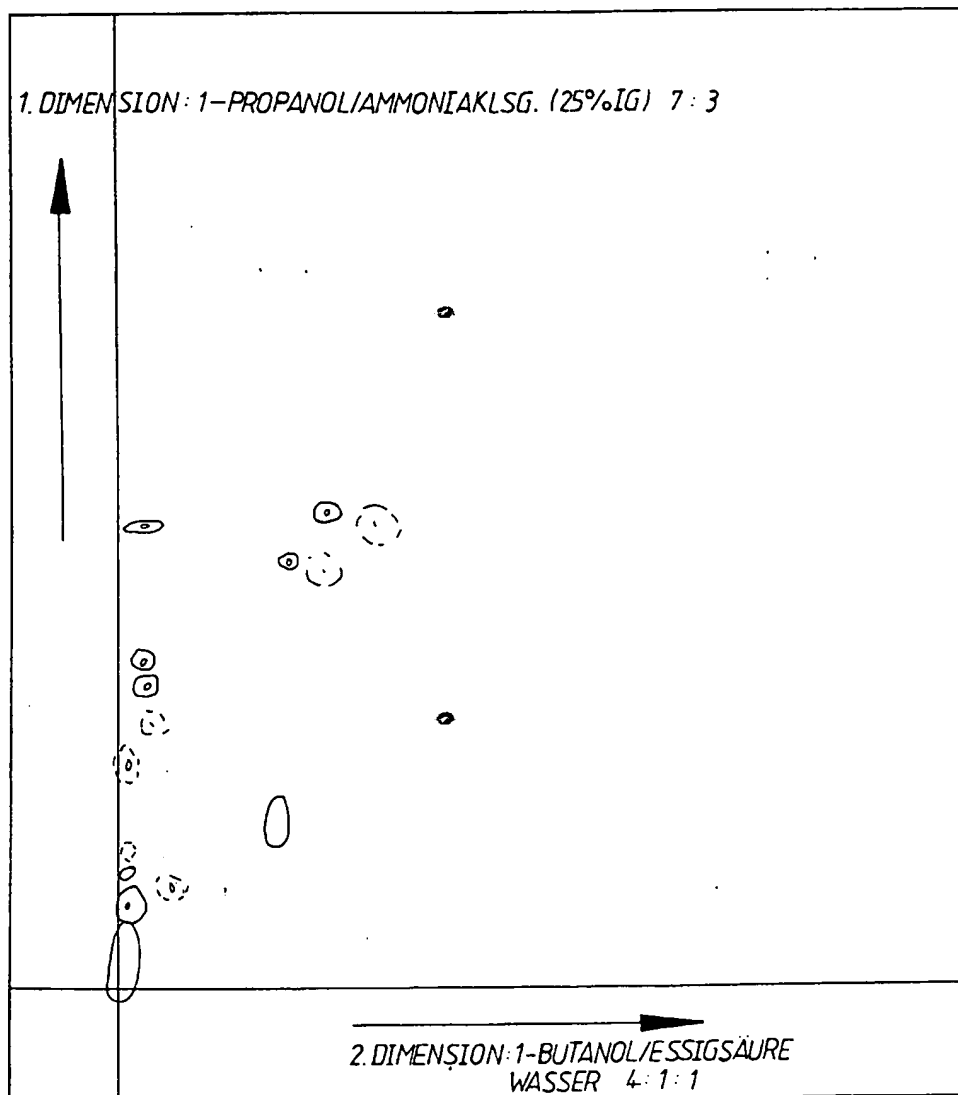
1. Präparat für kosmetische, pharmazeutische und biotechnologische Anwendungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß es die Aminosäuresequenz Gly-His-Lys und/oder Gly-Asp-Ser als Tripeptid und/oder Teilausschnitt von Peptiden in einer Konzentration von 10^{-12} bis 10^{-2} mol/L enthält. 30
2. Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es nach milder Hydrolyse von Kollagen, Gelatine, hydrolysiertes Kollagen, Elastin, Keratin und Bindegewebe in 0,5- bis 6,0n-HCl 0,1 Stunden bis 7 Tage bei Temperaturen zwischen 20°C und 121°C, Peptide und Aminosäuren in einer Konzentration von 10^{-12} bis 1 mol/L enthält. 35
3. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es Peptide in einer Konzentration von 10^{-12} bis 10^{-2} mol/L enthält, die als Partialhydrolysat durch enzymatische Behandlung mit Kollagenase als Clostridium histolyticum gewonnen werden. 40
4. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat Mineralelemente in einer Konzentration von jeweils 10^{-7} bis 10^{-1} mol/L enthält, vorzugsweise Mg, Mn, Cu, Co, Fe, Se, Mo und/oder Zn und/oder vorzugsweise in Form von Komplexen mit den Peptiden. 45
5. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Wirkungssteigerung vorzugsweise folgende Inhaltsstoffe der Haut und der Bindegewebe in ihrer natürlichen oder hydrolysierten Form in einer Konzentration von 10^{-12} bis 2 mol/L enthält: Saccharide, Polysaccharide, Mucopolysaccharide, Laminin, Entactin, Fibrillin, Vitronectin, Fibronectin, Nidogen, Tanescin, Filaggrin, Cytokine, Chalone, zellwachstumsstimulierende, zellwachstumshemmende Substanzen, Immunmodulatoren der Haut, Lipide, Phospholipide, Ceramide, Glycosphingolipide, DNA, RNA, Nukleotide, Nukleoside, Aminosäuren und/oder Enzyme der Haut. 50
6. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Reduzierung der Adsorption wirksamer Peptide an den Innenflächen der Glasgefäße oder Kunststoffgefäße 0,01% bis 30% einer Peptidmischung enthält, vorzugsweise 0,5% Soja-peptide. 55
7. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Reduzierung der Hydrolyse und der Inaktivierung der Peptide jeweils 1% bis 90% wasserlösliche Antioxidantien, Radikalfänger und/oder Radikalquencher enthält, vorzugsweise Ascorbinsäure, Glycerin, Mannit und/oder Sorbit. 60
8. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß für die Anwendung die Konzentration der isolierten Peptide oder der Peptide in den Partialhydrolysaten 10^{-12} bis 10^{-1} mol/L beträgt, vorzugsweise 10^{-7} mol/L für die kosmetische Anwendung und 10^{-3} mol/L für die pharmazeutische Anwendung, bezogen auf die Konzentration der Peptide in den kosmetischen, pharmazeutischen und biotechnologischen Endprodukten. 65
9. Präparat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Wirkungsspektrum des Präparats im Vergleich zu den nicht hydrolysierten Ausgangsmaterialien erweitert ist, vorzugsweise in bezug auf Zellatmungssteigerung, Stimulierung der Kollagensynthese und/oder Radikalfänger-Wirkung. 65

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

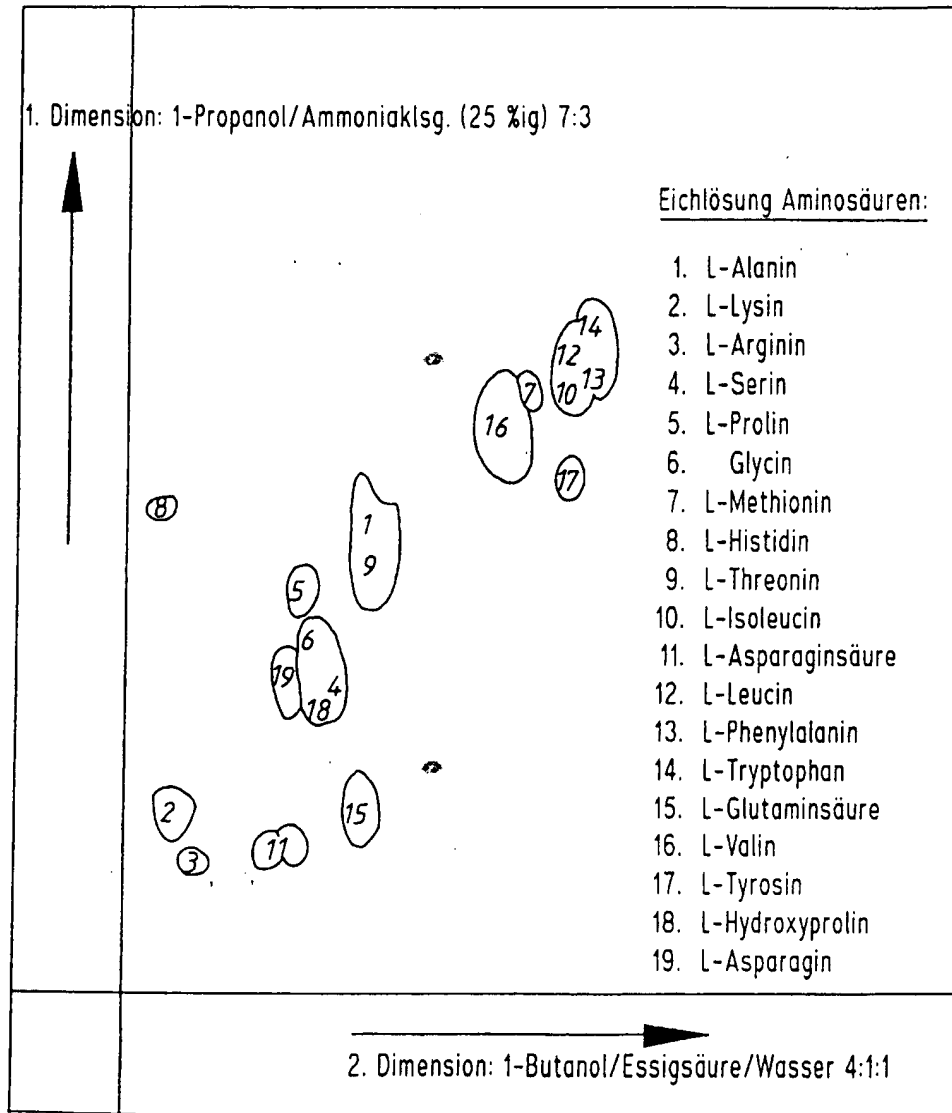
Figur 1: 2-dimensionale Dünnschichtchromatographie
von partialhydrolysierten Gelatine



FIGUR 1A: 2-DIMENSIONALE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE
VON PARTIALHYDROLYSIERTER GELATINE

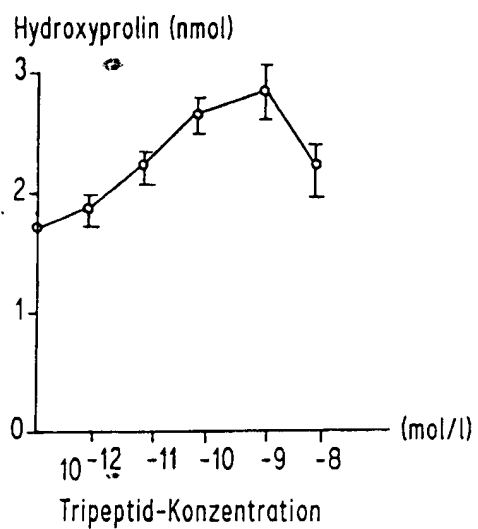


Figur 2: Standard-Aminosäurengemisch nach 2-dim. Dünnschichtchromatographie,
ähnlich wie ein Kollagen-Totalhydrolysat

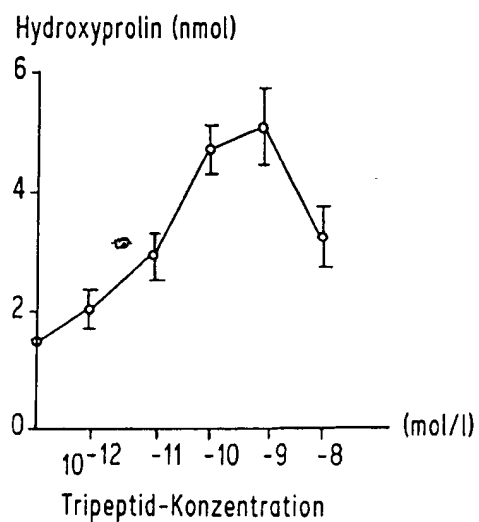


Figur 3: Wirkung des isolierten Tripeptids auf die Kollagensynthese von Fibroblasten der menschlichen Haut.

Figur 3.1.



Figur 3.2.



Figur 4: Aminosäureteilsequenz (Position 1-360) von Kollagen Typ I, α -1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

(extra-helical peptide, N-terminal): (GLU-

leu-ser-tyr -gly-tyr -ASP-GLU-LYS-ser-thr-gly -ile -ser-val-pro-)

gly-pro-met-gly-pro-ser-gly-pro-ARG-gly-leu-hyp-gly-pro-hyp-

15 gly-ala-hyp-gly-pro-gln-gly-phe-gln-gly-pro-hyp-gly-GLU-hyp-

30 gly-GLU-hyp-gly-ala-ser-gly-pro-met-gly-pro-ARG-gly-pro-hyp-

45 gly-pro-hyp-gly-LYS-asn-gly-ASP-ASP-gly-GLU-ala-gly-LYS-pro-

60 gly-ARG-hyp-gly-GLU-ARG-gly-pro-hyp-gly-pro-gln-gly-ala-ARG-

75 gly-leu-hyp-gly-thr-ala-gly-leu-hyp-gly-met-HYL-gly-HIS-ARG-

90 gly-phe-ser-gly-leu-ASP-gly-ala-LYS-gly-ASP-ala-gly-pro-ala-

105 gly-pro-LYS-gly-GLU-hyp-gly-ser-hyp-gly-GLU-asn-gly-ala-hyp-

120 gly-gln-met-gly-pro-ARG-gly-leu-hyp-gly-GLU-ARG-gly-ARG-hyp-

135 gly-ala-hyp-gly-pro-ala-gly-ala-ARG-gly-asn-ASP-gly-ala-ala-

150 gly-ala-ala-gly-pro-hys-gly-pro-thr-gly-pro-thr-gly-pro-hyp-

165 gly-phe-hyp-gly-ala-val-gly-ala-LYS-gly-GLU-ala-gly-pro-GLU-

180 gly-ala-ARG-gly-ser-GLU-gly-pro-gln-gly-val-ARG-gly-GLU-hyp-

195 gly-pro-hyp-gly-pro-ala-gly-ala-ala-gly-pro-ala-gly-asn-hyp-

210 gly-ala-ASP-gly-gln-hyp-gly-ala-LYS-gly-ala-asn-gly-ala-hyp-

225 gly-ile-ala-gly-ala-hyp-gly-phe-hyp-gly-ala-ARG-gly-pro-ser-

240 gly-pro-GLU-gly-pro-ser-gly-ala-hyp-gly-pro-LYS-gly-asn-ser-

255 gly-GLU-hyp-gly-ala-hyp-gly-asn-LYS-gly-ASP-thr-gly-ala-LYS-

270 gly-GLU-hyp-gly-pro-ala-gly-val-gln-gly-pro-hyp-gly-pro-ala-

285 gly-GLU-GLU-gly-LYS-ARG-gly-ala-ARG-gly-GLU-hyp-gly-pro-ser-

300 gly-leu-hyp-gly-pro-hyp-gly-GLU-ARG-gly-gly-hyp-gly-ser-ARG-

315 gly-phe-hyp-gly-ala-ASP-gly-val-ala-gly-pro-LYS-gly-pro-ala-

330 gly-GLU-ARG-gly-ser-hyp-gly-pro-ala-gly-pro-LYS-gly-ser-hyp-

345 gly-GLU-ala-gly-ARG-hyp-gly-GLU-ala-gly-leu-hyp-gly-ala-LYS-

Referenz: Collagen in Health and Disease, Umschlaginnenseiten

Eds, J.B.Weiss, M.I.V. Jayson, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982

Figur 5: Aminosäureteilsequenz (Position 1-360) von Kollagen Typ I, α -2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

(extra-helical peptide, N-terminal):

(GLU-phe-ASP-ala-LYS-gly-gly-gly-pro-)
 gly-pro-met-gly-leu-met-gly-pro-ARG-gly-pro-hyp-gly-ala-ser-
 15 gly-ala-hyp-gly-pro-gln-gly-phe-gln-gly-pro-hyp-gly-GLU-hyp-
 30 gly-GLU-hyp-gly-gln-thr-gly-pro-ala-gly-ala-ARG-gly-pro-hyp-
 45 gly-pro-hyp-gly-LYS-ala-gly-GLU-ASP-gly-HIS-hyp-gly-LYS-pro-
 60 gly-ARG-hyp-gly-GLU-ARG-gly-val-pro-gly-pro-gln-gly-ala-ARG-
 75 gly-phe-hyp-gly-thr-hyp-gly-leu-hyp-gly-phe-HYL-gly-ile-ARG-
 90 gly-HIS-asn-gly-leu-ASP-gly-leu-thr-gly-gln-hyp-gly-ala-hyp-
 105 gly-val-HYL-gly-GLU-hyp-gly-ala-hyp-gly-GLU-asn-gly-thr-hyp-
 120 gly-gln-HYL-gly-ala-ARG-gly-leu-hyp-gly-GLU-ARG-gly-ARG-val-
 135 gly-ala-hyp-gly-pro-ala-gly-ala-ARG-gly-ser-ASP-gly-ser-val-
 150 gly-pro-val-gly-pro-ala-gly-pro-ile-gly-ser-ala-gly-pro-hyp-
 165 gly-phe-hyp-gly-ala-hyp-gly-pro-HYL-gly-GLU-leu-gly-pro-val-
 180 gly-asn-hyp-gly-pro-ala-gly-pro-ala-gly-pro-ARG-gly-GLU-val-
 195 gly-leu-hyp-gly-leu-ser-gly-pro-val-gly-pro-hyp-gly-asn-ala-
 210 gly-pro-asn-gly-leu-hyp-gly-ala-HYL-gly-ala-ala-gly-leu-hyp-
 225 gly-val-ala-gly-ala-hyp-gly-leu-hyp-gly-pro-ARG-gly-ile-hyp-
 240 gly-pro-val-gly-ala-ala-gly-ala-thr-gly-ala-ARG-gly-leu-val-
 255 gly-GLU-hyp-gly-pro-ala-gly-ser-HYL-gly-GLU-ser-gly-asn-LYS-
 270 gly-GLU-hyp-gly-ala-val-gly-gln-hyp-gly-pro-hyp-gly-pro-ser-
 285 gly-GLU-GLU-gly-LYS-ARG-gly-ser-thr-gly-GLU-ile-gly-pro-ala-
 300 gly-pro-hyp-gly-pro-hyp-gly-leu-ARG-gly-asn-hyp-gly-ser-ARG-
 315 gly-leu-hyp-gly-ala-ASP-gly-ARG-ala-gly-val-met-gly-pro-ala-
 330 gly-ser-ARG-gly-thr-ser-gly-pro-ala-gly-val-ARG-gly-pro-asn-
 345 gly-ASP-ser-gly-ARG-hyp-gly-GLU-hyp-gly-leu-met-gly-pro-ARG-

Referenz: Collagen in Health and Disease, Umschlaginnenseiten

Eds, J.B.Weiss, M.I.V. Jayson, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982

Figur 6: Bestimmung
der Radikalfängerwirkung

